

P. ENT COOPERATION TREA

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

20 May 1999 (20.05.99)

International application No.

PCT/EP98/06134

Applicant's or agent's file reference

51352AWOM1XX

International filing date (day/month/year)

28 September 1998 (28.09.98)

Priority date (day/month/year)

30 September 1997 (30.09.97)

Applicant

WEBER, Alfred et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

03 March 1999 (03.03.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

C. Cupello

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

T. 17

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 10 JAN 2000

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 51352AWOM1XX	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06134	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 28/09/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 30/09/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/52		
Anmelder SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.


2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 03/03/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 29.12.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Huber, A Tel. Nr. +49 89 2399 8173



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/06134

I. Grundlag des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-25 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-24 eingegangen am 10/12/1999 mit Schreiben vom 07/12/1999

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-24
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-24
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-24
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten, sowie dazu geeignete Plasmide, Expressionskassetten und Mikroorganismen.
2. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: EP-A-0 486 290

D2: N.D. LEES ET AL.: 'Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*' LIPIDS, Bd. 30, Nr. 3, März 1995, Seiten 221-226

3. D1 offenbart eine Methode zur Akkumulierung von Squalen und spezifischer Sterole in Hefe. Dabei werden Hefemutanten, die defizient in der Expression von Sterol-Biosyntheseenzymen sind, mit einem Gen, das für ein Protein mit HMG-CoA- Reduktase Aktivität kodiert, transformiert. Die in D1 beschriebene Fermentation führt jedoch nicht zu Ergosterol.

D2 beschreibt die Klonierung von Genen, die an der Biosynthese von Ergosterol beteiligt sind (*erg9*, *erg1*, *erg7* etc.).

In keinem der im internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumente ist ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol offenbart oder nahegelegt, bei dem Mikroorganismen entweder mit einem Plasmid, auf dem mehrere an der Biosynthese zu Ergosterol beteiligte Gene inseriert sind oder mit mehreren Plasmiden, auf denen jeweils eines dieser Gene inseriert ist, transformiert werden.

Auch das spezifisch beanspruchte Plasmid pADL-SAT1 (Anspruch 12) und dessen Verwendung zur Herstellung von Ergosterol oder von Ergosterol-Zwischenprodukten ist im Stand der Technik weder beschrieben noch nahegelegt.

Das gleiche gilt für die Expressionskassetten gemäß Ansprüchen 16-18 und deren Verwendung, sowie für Mikroorganismen, die diese Expressionskassetten enthalten.

Der Gegenstand der vorliegenden Anmeldung wird somit als neu und erfinderisch angesehen (Art. 33(2) und (3) PCT).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten,
dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem mehrere geeignete Gene des Ergosterol-Stoffwechselweges inseriert sind
oder
 - b) zunächst Plasmide konstruiert, auf denen jeweils eines der Gene des Ergosterol-Stoffwechselweges inseriert ist,
 - c) mit den so hergestellten Plasmiden Mikroorganismen transformiert, wobei die Mikroorganismen mit einem Plasmid unter a) transformiert werden oder mit mehreren Plasmiden unter b) gleichzeitig oder nacheinander transformiert werden,
 - d) mit den so hergestellten Mikroorganismen eine Fermentation zu Ergosterol durchführt,
 - e) nach erfolgter Fermentation das Ergosterol und dessen Zwischenprodukte aus den Zellen extrahiert und analysiert und schließlich
 - f) das so erhaltenen Ergosterol und dessen Zwischenprodukte mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a-i) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene inseriert sind:
 - i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*),
 - ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
 - iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)und
 - iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG 1*),
- oder
- a-ii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene inseriert sind:
 - i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)und

ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*),

oder

a-iii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:

i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)

und

iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*),

oder

a-iv) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:

i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)

und

iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),

oder

a-v) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:

ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)

und

iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)

oder

a-vi) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:

ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)

und

iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),

oder

a-vii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:

iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)

und

iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),

oder

b) zunächst Plasmide konstruiert, auf denen jeweils eines der unter a-i) genannten Gene insertiert ist,

und

c) mit den so hergestellten Plasmiden Mikroorganismen transformiert, wobei die Mikroorganismen mit einem Plasmid unter a-i) bis a-vii)

transformiert werden oder mit mehreren Plasmiden unter b) gleichzeitig oder nacheinander transformiert werden,

d) mit den so hergestellten Mikroorganismen eine Fermentation zu Ergosterol durchführt,

e) nach erfolgter Fermentation das Ergosterol und dessen Zwischenprodukte aus den Zellen extrahiert und analysiert und schließlich

f) das so erhaltenen Ergosterol und dessen Zwischenprodukte mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Plasmid unter a-ii), a-iii) und a-v) zusätzlich das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*) und auf dem Plasmid a-ii) zusätzlich das Gen der Acyl-CoA: Sterol-Acyl-transferase insertiert ist.

4. Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß man die in Anspruch 1 unter a), die in Anspruch 2 unter a-i) bis a-vii) und die in Anspruch 3 unter a-ii), a-iii) und a-v) genannten Gene mit den Plasmiden zunächst jeweils unabhängig voneinander in Mikroorganismen gleicher Spezies einführt und mit diesen gemeinsam eine Fermentation zu Ergosterol durchführt und das so erhaltene Ergosterol aus den Zellen extrahiert, analysiert und mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.

5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zwischenprodukte Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Ergost-7-enol und Ergosta-5,7-dienol sind.

6. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zwischenprodukte Sterole mit 5,7-Dienstruktur sind.

7. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide die Plasmide YEpH2 (Fig. 1), YDpUHK3 (Fig. 2) und pADL-SAT1 (Fig. 3) sind.
- 5 8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen Hefen sind.
- 10 9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es die Spezies *S. cerevisiae* ist.
- 15 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es der Stamm *S. cerevisiae* AH22 ist.
- 20 11. Hefestamm *S. cerevisiae* AH22, enthaltend eines oder mehrerer der im Verfahren unter a-i) genannten Gene.
- 25 12. Plasmid pADL-SAT1 (Fig. 3), bestehend aus dem SAT1-Gen und dem LEU2-Gen aus YEp13.
- 30 13. Verwendung des Plasmids gemäß Anspruch 12, zur Herstellung von Ergosterol.
- 35 14. Verwendung des Plasmids gemäß Anspruch 12, zur Herstellung der Ergosterol - Zwischenprodukte Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Ergost-7-enol und Ergosta-5,7-dienol.
15. Verwendung des Plasmids gemäß Anspruch 12, zur Herstellung von Sterolen mit 5,7-Dienstruktur.

16. Expressionskassette, umfassend den mittleren *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen, den *TRP*-Terminator und das *SAT1*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator.

5

17. Expressionskassetten, umfassend den mittleren *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen, den *TRP*-Terminator, das *SAT1*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator und das *ERG9*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator.

10

18. Kombination aus Expressionskassetten, wobei die Kombination aus
- a) einer ersten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen und der *TRP*-Terminator lokalisiert ist,
 - b) einer zweiten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *SAT1*-Gen und der *TRP*-Terminator lokalisiert ist,
- und
- c) einer dritten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *ERG9*-Gen mit dem *TRP*-Terminator lokalisiert ist.

15

20

19. Verwendung der Expressionskassetten gemäß den Ansprüchen 16 bis 18, zur Transformation von Mikroorganismen, die bei der Fermentation zu Ergosterol eingesetzt werden.

25

20. Verwendung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus Hefe ist.

30

21. Mikroorganismen, enthaltend Expressionskassetten gemäß den Ansprüchen 16 bis 18.

35

22. Mikroorganismus gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß es Hefe ist.

23. Verwendung des Mikroorganismus gemäß den Ansprüchen 21 und 22, bei der Fermentation zu Ergosterol.

5

24. Verwendung des Mikroorganismus gemäß den Ansprüchen 21 und 22, bei der Fermentation zu Ergosterol-Zwischenprodukten.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 51352AWOM1XX	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/ 06134	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 28/09/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 30/09/1997
Anmelder SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/52 C12N15/81 C12N1/19 C12P5/02 C12P7/04
C12P7/02 C12P33/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 486 290 A (AMOCO CORP) 20. Mai 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1-26
A	EP 0 313 465 A (PERNOD RICARD) 26. April 1989 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1-26
A	V. ARIES AND B.H. KIRSOP: "Sterol Biosynthesis by strains of Saccharomyces cerevisiae in the presence and absence of dissolved oxygen" J. INST. BREWING, Bd. 84, Nr. 2, März 1978 - April 1978, Seiten 118-122, XP002094330 London, UK siehe das ganze Dokument ---- -/-	1-26

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Februar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	K. ALLEN ET AL.: "Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOL., Bd. 63, Nr. 9, September 1997, Seiten 3341-3344, XP002094331 AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, DC, US siehe das ganze Dokument ---	1-26
A	N.D. LEES ET AL.: "Cloning of the late genes in the ergosterol Biosynthetic pathway of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " LIPIDS, Bd. 30, Nr. 3, März 1995, Seiten 221-226, XP002094332 AOCS Press,us siehe das ganze Dokument ---	1-26
A	M.E. BASSON ET AL.: " <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase" PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 83, August 1986, Seiten 5563-5567, XP002094333 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; siehe das ganze Dokument ---	1-26
A	S.M. JENNINGS ET AL.: "Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalen synthetase" PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 88, Juli 1991, Seiten 6038-6042, XP002094334 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; siehe das ganze Dokument ---	1-26
A	A. JANDROSITZ ET AL.: "The gene encoding squalene epoxidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : cloning and characterization" GENE, Bd. 107, 1991, Seiten 155-160, XP002094335 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL; in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/--	1-26

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>C. YU ET AL.: "Molecular cloning and characterization of two isoforms of Saccharomyces cerevisiae Acyl-CoA:Sterol Acyltransferase"</p> <p>J. BIOL. CHEM., Bd. 271, Nr. 39, 27. September 1996, Seiten 24157-24163, XP002094336 AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06134

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 0486290	A	20-05-1992	US	5460949 A		24-10-1995
			JP	5192184 A		03-08-1995
<hr/>						
EP 0313465	A	26-04-1989	FR	2622208 A		28-04-1989
			DE	3880619 A		03-06-1993
			DK	589288 A		23-04-1989
			ES	2054847 T		16-08-1994
			IE	62461 B		08-02-1995
<hr/>						

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 51352AWOM1XX	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/06134	International filing date (day/month/year) 28 September 1998 (28.09.98)	Priority date (day/month/year) 30 September 1997 (30.09.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/52, 15/81, 1/19, C12P 5/02, 7/04, 7/02, 33/00		
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>6</u> sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 03 March 1999 (03.03.99)	Date of completion of this report 29 December 1999 (29.12.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/06134

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-25, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-24, filed with the letter of 07 December 1999 (07.12.1999),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/4 - 4/4, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06134

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The present application concerns a method for producing ergosterol and intermediate products thereof, and plasmids, expression cassettes and micro-organisms suitable thereto.
2. The following documents are referred to:

D1: EP-A-0 486 290
D2: N.D. LEES ET AL.: 'Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*', LIPIDS, Vol. 30, No. 3, March 1995, pages 221-226.
3. D1 discloses a method for accumulating squalene and specific sterols in yeast. Yeast mutants, which are deficient in the expression of sterol biosynthetic enzymes, are transformed with a gene which encodes a protein having HMG-CoA reductase activity. The fermentation described in D1 does not, however, lead to ergosterol.

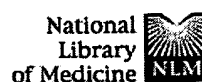
D2 describes the cloning of genes which are involved in the biosynthesis of ergosterol (erg9, erg1, erg7, etc).

None of the documents cited in the international search report discloses or renders obvious a method for the production of ergosterol in which micro-organisms are transformed either with one plasmid in which several genes involved in the biosynthesis to ergosterol are inserted or with several plasmids in which one of these genes is inserted.

The specifically claimed plasmid pADL-SAT1 (Claim 12) and its use in the production of ergosterol or intermediate products thereof is not described in the prior art either, nor is it obvious therefrom.

The same applies to the expression cassettes as per Claims 16-18 and their use, and to micro-organisms containing these expression cassettes.

The subject matter of the present application is consequently considered novel and inventive (PCT Art. 33(2) and (3)).



PubMed	Nucleotide	Protein	Genome	Structure	PopSet	Taxonomy	OMIM	Books
Search PubMed	<input checked="" type="checkbox"/> for Limits	Preview/Index	History	Clipboard	Details	Go	Clear	
Display	Abstract	<input type="checkbox"/> Sort	<input type="checkbox"/> Save	Text	Clip Add	Order		

Entrez PubMed

☐ 1: Science 1996 May 31;272(5266):1353-6

Related Articles, Domains, Nucleotide, OMIM, Protein, Books, LinkOut

Sterol esterification in yeast: a two-gene process.

PubMed Services

Yang H, Bard M, Bruner DA, Gleeson A, Deckelbaum RJ, Aljinovic G, Pohl TM, Rothstein R, Sturley SL.

Institute of Human Nutrition, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, 10032, USA.

Related Resources

Unesterified sterol modulates the function of eukaryotic membranes. In human cells, sterol is esterified to a storage form by acyl-coenzyme A (CoA): cholesterol acyl transferase (ACAT). Here, two genes are identified, ARE1 and ARE2, that encode ACAT-related enzymes in yeast. The yeast enzymes are 49 percent identical to each other and exhibit 23 percent identity to human ACAT. Deletion of ARE2 reduced sterol ester levels to approximately 25 percent of normal levels, whereas disruption of ARE1 did not affect sterol ester biosynthesis. Deletion of both genes resulted in a viable cell with undetectable esterified sterol. Measurements of [¹⁴C]acetate incorporation into saponified lipids indicated down-regulation of sterol biosynthesis in the are1 are2 mutant cells. With the use of a consensus sequence to the yeast and human genes, an additional number of the ACAT gene family was identified in humans.

PMID: 8650549 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Display	Abstract	<input type="checkbox"/> Sort	<input type="checkbox"/> Save	Text	Clip Add	Order
---------	----------	-------------------------------	-------------------------------	------	----------	-------

Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH
Department of Health & Human Services
[Freedom of Information Act](#) | [Disclaimer](#)

i686-pc-linux-gnu Jun 12 2002 10:20:00